

ALESSANDRO GARRETT DRONK

**MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE PARA CULTIVO
IN VITRO DE *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb.f.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Francine Lorena
Cuquel

CURITIBA

2004

Dronk, Alessandro Garrett

Meios de cultura e condições de luminosidade para cultivo *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb.f. / Alessandro Garrett Dronk.—Curitiba, 2004.

xi, 33 f.

Orientador: Luiz Antonio Biasi.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

1. Orquídea – Propagação *in vitro*. 2. Orquídea – Semente – Propagação. 3. Plantas ornamentais. 4. *Cattleya*. I. Título.

CDD 635.93415

CDU 631.532:635.935.942



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pelo candidato **ALESSANDRO GARRETT DRONK**, sob o título **“MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE PARA CULTIVO IN VITRO DE *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb.f.”**, para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato são de parecer pela **"APROVAÇÃO"** da Dissertação.

Curitiba, 27 de Abril de 2004.

Professor Dr. Ricardo Tadeu de Faria
Primeiro Examinador

Professora Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas
Segunda Examinadora

Professora Dra. Francine Lorena Cuquel
Terceira Examinadora

Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Presidente da Banca e Orientador

DEDICATÓRIA

Dedico

Aos meus queridos pais **Dionísio Dronk** e **Terezinha Garrett Dronk** por tudo que fizeram por mim.

À minha amada esposa **Anamaria Roffé Garrett Dronk** pelo incentivo, amizade e compreensão.

“As orquídeas são instrumentos sinfônicos, que uso
para contar a história de uma sinfonia que é a natureza”

Roberto Burle Marx

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação em Agronomia – Produção Vegetal da Universidade Federal do Paraná.

Ao Professor Doutor Luiz Antônio Biasi, pela amizade, dedicada orientação, apoio, paciência e compreensão .

À Professora Doutora Francine Lorena Cuquel, pela co-orientação, amizade, incentivo e valiosas sugestões .

Ao Professor Doutor Valdo José Cavallet, que desde a época da graduação me incentivou.

Ao Professor Doutor Ricardo Tadeu de Faria, pela amizade e valiosas sugestões.

Ao meu irmão Bruno Garrett Dronk, pelo carinho.

À Malvina Maria Richiuki dos Santos, pela dedicação que teve comigo desde criança.

Ao Sr. Júlio, Dona Cecília, Rogério e Flávia, pelas palavras de incentivo.

Ao amigo Hary Eugênio Junghans que me ensinou a “arte” do cultivo *in vitro*.

Ao Shigueo, Célio, Thomas e Ana Carolina, meus “Amigos para sempre”.

Ao Tio Pedro de Almeida Garrett Sobrinho (*In Memoriam*) pelo exemplo.

Aos colegas de mestrado Alexandre Drefahl, Roberson Dibax, Lizane Lúcia de Souza, pela troca de experiências e momentos de descontração.

À Associação Paranaense de Orquidófilos, por disponibilizar a sua biblioteca e pelos conhecimentos lá ofertados.

A todas as pessoas que, embora não citadas, contribuíram para que fosse possível o desenvolvimento desta pesquisa.

BIOGRAFIA DO AUTOR

ALESSANDRO GARRETT DRONK, filho de Terezinha Garrett Dronk e Dionísio Dronk, nasceu em Curitiba, Estado do Paraná, aos 21 dias do mês de fevereiro de 1974.

Cursou o ensino de primeiro grau no Colégio Bom Jesus e o segundo grau no Centro de Educação Tecnológica do Paraná (CEFET/PR), onde concluiu o curso de Auxiliar Técnico em Edificações. Em 1996 ingressou no curso de Engenharia Agrônoma na Universidade Federal do Paraná, recebendo o grau de Engenheiro Agrônomo em agosto de 2001.

No ano de 2001 ingressou no curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná, sob orientação do Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Cattleya amethystoglossa</i> Linden & Rehb. f.	3
2.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES <i>IN VITRO</i>	4
2.2.1 Meios de cultura.....	5
2.2.2 Intensidade luminosa	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 OBTENÇÃO DAS PLANTAS.....	12
3.2 EXPERIMENTO COM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA	13
3.3 EXPERIMENTO COM DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS	14
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1 EXPERIMENTO COM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA	18
4.2 EXPERIMENTO COM DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS.....	22
5 CONCLUSÕES.....	25
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXOS	31

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Flor da <i>Cattleya amethystoglossa</i> Linden & Rchb. f.	4
FIGURA 2	Aspecto do tubo de ensaio no momento da desinfestação das sementes de <i>Cattleya amethystoglossa</i>	13
FIGURA 3	Aspecto das plantas de <i>Cattleya amethystoglossa</i> Linden & Rchb. f., após 180 dias de desenvolvimento nos meios de cultura Dronk (1), MS (2) e Knudson C (3).....	20
FIGURA 4	Detalhe de uma planta de <i>Cattleya amethystoglossa</i> Linden & Rchb. f., após 180 dias de desenvolvimento nos meios de cultura Dronk (1), MS (2) e Knudson C (3).....	20
FIGURA 5	Aspecto de algumas plantas de <i>Cattleya amethystoglossa</i> Linden & Rchb. f. plantadas em vasos coletivos 1 – Meio Dronk, 2- Meio MS, 3- Meio Knudson C.....	22
FIGURA 6	Aspecto de algumas plantas de <i>Cattleya amethystoglossa</i> Linden & Rchb. f. após 160 dias de desenvolvimento no meio MS expostas a diferentes intensidades luminosas:1- $10\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 2 - $22,5\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 3 - $25\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	24

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Alguns componentes orgânicos da água de coco.....	7
----------	---	---

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Composição nutricional da banana (por 100g de porção comestível).....	8
TABELA 2	Fotoperíodo e intensidade luminosa, utilizados na germinação e desenvolvimento de várias espécies de orquídeas segundo ARDITTI (1982).....	10
TABELA 3	Composição química dos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), KC (Knudson C, 1946) e Dronk.....	16
TABELA 4	Efeito de diferentes meios de cultura no desenvolvimento de <i>Cattleya amethystoglossa in vitro</i> após 180 dias. Médias de dois experimentos.	18
TABELA 5	Comparação de custo entre os meios de cultura utilizados no desenvolvimento da <i>Cattleya amethystoglossa in vitro</i> (novembro/2003).....	21
TABELA 6	Efeito das diferentes intensidades luminosas no desenvolvimento de <i>Cattleya amethystoglossa in vitro</i> após 160 dias.....	23

RESUMO

Cattleya amethystoglossa Linden & Rchb.f. é uma orquídea com abundante florescimento, grande beleza, e de valor ornamental. A propagação via sementes de orquídeas *in vitro* é mais eficiente que a propagação *ex vitro*. A propagação *in vitro* permite produzir plantas sem doenças em larga escala e durante o ano todo. Diversos meios de cultura são utilizados na semeadura de orquídeas. Devido ao alto custo e dificuldade de obter alguns componentes do meio de cultura como nitrato de amônia e nitrato de potássio, meios de cultura alternativos podem ser tão eficientes e ter menor custo que os meios tradicionais. O objetivo deste experimento foi comparar o meio Dronk, um meio que contém banana e água de coco, com os meios MS e Knudson C. O meio Dronk foi mais eficiente e de menor custo que os demais. Outro experimento foi implantado no meio MS para avaliar intensidades luminosas na produção de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb.f.. As intensidades luminosas testadas foram 10,8 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 24,3 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 27 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. O melhor resultado obtido foi com 10,8 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Palavras-chave: Orquídea, semente, propagação, intensidade luminosa, planta ornamental, floricultura.

ABSTRACT

Cattleya amethystoglossa Linden & Rchb.f. is an orchid with abundant bloom, great beauty, and high ornamental value. *In vitro* orchid propagation by seeds is more efficient than *ex vitro* seed propagation. It allows producing plants without diseases infection, large scale, and during the whole year. Several culture media have been employed to sown orchid seeds. Due to the high costs and difficulties to obtain some culture media components, such as ammonia-nitrate and potassium nitrate, alternative medias might be as efficient and have lower costs than the traditional media. The goal of this experiment was to compare Dronk media, a media containing banana and coconut water, with MS and Knudson C medias. Dronk media was more efficient and showed lower cost than MS and Knudson C media. Another experiment was set up in MS media to evaluate light intensities to produce *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb.f. Light intensities evaluated were $10,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $24,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and $27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Better results were obtained with $10,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Key-words: Orchid, seed, propagation, light-intensity, ornamental-plant, floriculture

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade as orquídeas são apreciadas, seja pela sua beleza ou por suas propriedades medicinais e foi em função destas ditas propriedades medicinais que a orquídea tem este nome. Teofrasto, discípulo de Aristóteles, em 370 a.C. batizou certas plantas que cresciam às margens do Mediterrâneo de *Orchis* que em grego significa testículo, em alusão a forma dos bulbos dessas plantas. Das *orchis* era feito um caldo que teria propriedades afrodisíacas.

Em função da beleza de suas flores as orquídeas se tornaram plantas muito desejadas pelos orquidófilos, por isso muitas espécies estão correndo risco de extinção. A preservação de orquídeas utilizando técnicas de micropropagação é uma opção para a produção de orquídeas em grande escala, o que atende tanto o mercado de colecionadores quanto o mercado de floricultura.

A sementeira *in vitro* de orquídeas mostra-se de grande importância para obtenção de plantas de qualidade superior, seja no aspecto de beleza floral ou no aspecto sanitário, por se cultivar as plantas desde o início em ambiente controlado a incidência de pragas e doenças é muito baixa garantindo desta forma o vigor e a sanidade das plantas. A cultura assimbiótica ou sementeira *in vitro*, de orquídeas, constitui técnica bastante relevante de ponto de vista comercial e também ecológico. As plantas produzidas desta forma são altamente interessantes para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental. A cultura assimbiótica resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos, simbioses muitas vezes espécie-específicos (MARTINI *et al.*, 2001). Por questões fisiológicas a propagação de orquídeas via semente, que vise produzir um grande número de plantas, só é possível se estas sementes forem semeadas *in vitro*, caso contrário o número de sementes que germinam é ínfimo. Outro fator de suma importância é que pela sementeira *in vitro* muitas orquídeas foram preservadas livrando-as da extinção, já que muitas vezes seu habitat foi completamente destruído por interesses outros.

O cultivo *in vitro* tem permitido que a produção em escala comercial de orquídeas seja feita de forma planejada, o que permite ao produtor atender ao mercado durante praticamente o ano inteiro.

A produção comercial de orquídeas é uma atividade crescente no mercado de flores brasileiro assim como internacionalmente, movimentando bilhões de dólares anualmente (MORAES, 2003).

Este trabalho tem como objetivo geral propor uma metodologia mais eficiente e de menor custo para a propagação *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb.f.

Os objetivos específicos foram os seguintes: comparar a eficiência de três meios de cultura no cultivo *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb. f.; avaliar a influência da intensidade luminosa na qualidade das mudas de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb. f. propagadas *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rehb. f.

A *Cattleya amethystoglossa* é uma orquídea brasileira que ocorre dispersa pelo sul da Bahia, sempre acompanhando a serra do mar, em uma altitude variando entre 900 e 1200 metros. Também pode ser encontrada no norte do Estado do Espírito Santo e algumas regiões serranas do nordeste de Minas Gerais.

Segundo CAMPACCI (2000), a *Cattleya amethystoglossa* possui pseudobulbos longos com altura que pode chegar a 1 metro e com diâmetro variando de 1 a 1,5 cm são cilíndricos e sulcados longitudinalmente, bifoliados ou mesmo trifoliados, com folhas rígidas, coriáceas, de forma elíptica, com tamanho variável, chegando a quase 15 cm de comprimento por 8 cm de largura. Inflorescência apical erecta ostentando muitas flores densamente agrupadas. As flores têm pouco menos de 10 cm de diâmetro. Possuem pétalas de tamanho variável, em geral com 5 cm de comprimento por 2,5 cm de largura, de forma elíptica, sépalas um pouco mais compridas, porém mais estreitas sendo a dorsal elíptico-lanceolada e as laterais levemente falcadas, às vezes com o ápice um pouco para trás. Labelo com 4 cm de comprimento por 3 de largura quando explanado, trilobado, com o lobo mediano mais ou menos reniforme e os laterais falcados. O lobo central é cor de ametista intenso, de textura verrucosa, os laterais envolvem completamente a coluna são internamente amarelados e externamente rosados ou esbranquiçados, com ápice dobrado para fora e da mesma cor do central. As pétalas e sépalas têm cor variável desde esbranquiçadas ou salmão até rosa forte, podendo ou não ser salpicadas com máculas mais escuras, da mesma cor do labelo. A floração ocorre no inverno e primavera brasileiros (Figura 1).



Figura 1 – Flor da *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb. f.

2.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES *IN VITRO*

Durante muitos anos acreditou-se que as sementes de orquídeas não eram viáveis ou mesmo incapazes de germinar, sendo a multiplicação destas plantas feita por meio de gema ou estruturas semelhantes à gema, as quais, por meio de uma série de metamorfoses, originariam plantas maduras (ARDITTI, 1967¹, citado por KERBAUY & HANDRO, 1981). De acordo ainda com este autor, a primeira descrição sobre germinação de sementes de orquídeas foi feita, por Salisbury, em 1804, em *Bletilla* Rchb.f., *Orchis morio* L. e *Limodorum verecundrum* Prodr., sendo que a esta descrição inicial seguiram-se outras, feitas por diferentes autores, com os mais diferentes gêneros e espécies. Provara-se assim, através destas pesquisas, de forma definitiva, que as orquídeas também produziam sementes férteis capazes de germinar; entretanto, permaneciam ainda obscuros os fatores envolvidos na sua germinação (KERBAUY & HANDRO, 1981).

¹ Arditti, J. Factors affecting the germination of orchids seeds. **Botanical Review**. v.33, p. 1 –97, 1967.

Em 1916, o botânico Lewis Knudson, um pesquisador interessado na influência dos carboidratos sobre o metabolismo das plantas superiores, analisou a constituição do extrato radicular de *Ophris* sp. na germinação de sementes de orquídea, tendo encontrado 48% de mucilagem, 27% de amido, 5% de proteína, alguns açúcares e sais minerais. Baseado nestes resultados e nos relatos já existentes sobre a possibilidade do fungo simbiote atuar na digestão do açúcar de cana, sugeriu que este microrganismo participaria da germinação destas sementes através da quebra de moléculas de substâncias quimicamente complexas, como o amido e substâncias nitrogenadas, transformando-as em substâncias mais simples, passíveis de utilização pelo embrião.

2.2.1. Meios de cultura

Em 1922, Lewis Knudson formulou um meio de cultura quimicamente sintético, constituído unicamente de sais minerais, açúcar e ágar, no qual inoculou sementes oriundas de *Cattleya*, *Laelia* e *Epidendrum*. Estas sementes germinaram abundantemente, mostrando de forma definitiva que o fungo *per se* não era imprescindível para germinação destas sementes (ARDITTI, 1967¹, citado por KERBAUY & HANDRO, 1981).

A multiplicação de orquídeas por sementes é demorada e dos aproximados 2,5 milhões de sementes produzidas numa cápsula, somente 5% germinam. O cultivo em meio nutritivo permite acelerar esse processo e elevar a taxa de germinação, tornando o processo de multiplicação de orquídeas comercialmente viável (MORAES, 2003).

Os meios nutritivos utilizados para cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células. Por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender as necessidades específicas *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998).

Experimentos realizados ao longo de anos vêm evidenciando que, dentro da família *Orchidaceae*, as condições de cultivo são específicas para os gêneros e algumas vezes para espécies pertencentes ao mesmo gênero (ARDITTI & ERNST, 1992).

Durante anos, o meio WHITE (1943) foi utilizado como meio básico para a cultura de uma grande variedade de tecidos de diferentes espécies. O meio MS de MURASHIGE & SKOOG (1962) foi desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio White com extrato de folhas de fumo. Foi demonstrado que a fração do extrato que mais estimulou o crescimento era aquela dos componentes inorgânicos. O meio MS, juntamente com o B5 de GAMBORG *et al.* (1968) é usado na cultura de tecidos da grande maioria das espécies (CALDAS *et al.*, 1998).

Misturas complexas como extrato de levedura e extratos de folha de fumo tiveram papel importante no desenvolvimento de meios nutritivos. Alguns dos aditivos usados na categoria de misturas incluem a água de coco e o extrato de malte. Extratos do mesmo material vegetal foram, também, muito utilizados, principalmente no início dos estudos com determinada espécie: suco de tomate para cultura de frutos imaturos de *Lycopersicon esculentum*, extrato de sementes de *Pinus*, suco de batata para calo de *Solanum tuberosum* e suco de cenoura para calo de *Daucus carota* (CALDAS *et al.*, 1998).

RAMOS (1969) afirmou que o tomate tem qualidades extraordinárias no meio de cultura utilizado para germinação de sementes de orquídeas. Em outra fórmula para germinação de orquídeas, RAMOS (1969) indicou o uso de feijão, batata e tomate como componentes do meio. De todos, a água de coco é o aditivo que tem sido mais utilizado para um grande número de espécies *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998). SILVA (1986) recomendou o uso de água de coco verde por se tratar de uma substância rica em elementos assimiláveis pelas plantas de orquídeas em geral.

Nos meios de cultura, tanto para semear como para clonar orquídeas, CAMPOS (1996 e 2000) utilizou a água de coco, em especial na clonagem de *Cymbidium*. KERBAUY & HANDRO (1981) utilizando sementes de um híbrido primário entre (*Cattleya gutata* X *Epidendrum mosenii*), constataram que os tubos de ensaio com meio líquido suplementado com 150 ml de água de coco formaram tufo de plantas completas. Trabalhando com protocórmios de *Spathoglottis plicata*, WANG *et al.* (2003) adicionaram 10% de leite de coco ao meio MS.

Na micropropagação de *Diuris longifolia*, uma orquídea terrestre da Austrália, COLLINS & DIXON (1992) utilizaram dois meios de cultura o Vacin e Went 1949 e o meio Pa5 200 e ambos os meios foram suplementados com 200 ml de água de coco.

A água de coco é uma mistura muito complexa, com uma ampla gama de componentes orgânicos e inorgânicos (Quadro 1). Também tem boa capacidade tampão

e normalmente possui sais, sendo muito rica em magnésio e fósforo. Tem um conteúdo de açúcar, ao redor de 2,5 %. Também é encontrado na água de coco, nitrogênio não protéico solúvel, na forma de aminoácidos (KRIKORIAN, 1991).

QUADRO 1- Alguns componentes orgânicos da água de coco.

Aminoácidos	Vitaminas
Aspártico, glutâmico Serina, aminobutírico Asparagina, Glicina β - Alanina, Treonina Histidina, Glutamina Arginina, Lisina Valina, Metionina Tirosina, Prolina Homoserina Fenilalanina Hidróxiprolina	Ácido nicotínico Ácido pantotênico Biotina, riboflavina Ácido fólico Tiamina Piridoxina Ácido ascórbico
Outros compostos nitrogenados	Substâncias de crescimento
Amônio, Etanolamina Dihidroxifenilalanina	Auxina Giberelina 1,3-Difenilurea Zeatina Glucosídio de zeatina Ribosídio de zeatina
Ácidos orgânicos	Outros
Shikímico, químico Pirrolidona-carboxílico Succínico, málico Cítricos e desconhecidos	ARN-Polimerase Uracilo, Adenina Leucoantocianinas Fosfatase ácida Diastasa Deshidrogenase Peroxidase Calatasa
Açúcares	
Sacarose Frutose Glucose	
Álcoois de açúcar	
Sorbitol m-Inositol Siloinositol	

Fonte: Krikorian, 1991

Outro elemento orgânico utilizado como aditivo nos meios de cultura é a polpa de banana, a qual é muito rica em potássio, fósforo e magnésio (Tabela 1). Segundo ARDITTI & ERNST (1992), a polpa de banana foi utilizada pela primeira vez em 1950 no Brasil por Graeflinger, num meio para germinação de sementes de orquídeas. O uso de banana em meios para germinação tornou-se popular depois disso.

Extrato de banana, amendoim, de mamão, de figo, de manga e de groselha chinesa foram individualmente adicionados no meio Knudson C para crescimento de *Phalaenopsis* sp. O extrato de banana foi o mais efetivo, seguido pelos de amendoim, de mamão, de figo, de manga e de groselha chinesa. (ERNST *et al.*, 1971² citado por MORAES, 2003). Em outros estudos os mesmos autores, utilizaram o extrato de banana que resultou em maior crescimento de *Cattleya aurantiaca* do que os outros extratos. CAMPOS, (1996) adicionou 40 g de banana nanica ao meio de cultura que utilizou para semear orquídeas do gênero *Cattleya*, *Laelia* e *Phalaenopsis*. Para o cultivo a partir de sementes de *Anoectochilus formosanus*, uma orquídea medicinal de Taiwan, SHIAU *et al.* (2002) acrescentaram 8% de polpa de banana ao meio de cultura MS.

Em trabalho com clonagem de *Paphiopedilum*, HUANG *et al.* (2001) complementaram o meio de cultura MS com 15% v/v de leite de coco e diversas quantidades de polpa de banana.

TABELA 1 – Composição nutricional da banana (por 100g de porção comestível).

Composição	Quantidade
Energia (cal)	85,0
Proteína (%)	1,1
Gordura (%)	0,2
Carboidratos (%)	22,2
Cálcio (mg)	8,0
Potássio (mg)	370,0
Fósforo (mg)	26,0
Ferro (mg)	0,7
Sódio (mg)	1,0
Magnésio (mg)	33,0
Vitamina A (UI)	190,0
Tiamina (mg)	50,0
Riboflavina (mg)	60,0
Niacina (mg)	0,7
Vitamina C (mg)	10,0

Fonte: www.nucleoestudo.ufla.br/nefrut/Tabela2.htm

² Ernst, R.T.; Arditti, J.; Heartley, P. L. Carbohydrate physiology of orchid seedlings. II Hydrolysis and effects of oligosaccharides. *American Journal of Botany*. v. 58, p. 827-835, 1971.

2.2.2. Intensidade luminosa

Diversos autores testando outras variáveis em orquídeas utilizaram uma grande amplitude de intensidades luminosas variando de $2,7 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (BARROSO *et al.*, 1990) até $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (MARTINI *et al.*, 2001) e diferentes fotoperíodos variando entre 10 horas (ARDITTI, 1982; BARROSO *et al.*, 1990) até 24 horas (WILFRET, 1966; KIM *et al.*, 1970; MILANEZE, 1992; MIYOSHI & MII, 1995). Em trabalho com germinação de orquídeas terrestres do Oeste europeu, WAES & DEBERGH (1986) utilizaram um fotoperíodo de 14 horas com intensidade luminosa de $30,4 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

ARDITTI & ERNST (1992) citaram que muitos aspectos da luz são de grande importância na micropropagação de orquídeas, como a sua presença ou ausência (claro ou escuro), duração (fotoperíodo), intensidade (i.e., níveis de energia), qualidade (cor) e fonte (natural, incandescente, fluorescente).

Trabalhando com protocórmios de *Cymbidium*, WILFRET (1966) utilizou duas intensidades luminosas, primeiro 50 foot-candle (ft-c) ($6,7 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) por quatro semanas e depois 200 ft-c ($27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), com fotoperíodo de 24 horas nas duas intensidades luminosas, alcançando desenvolvimento satisfatório na formação dos protocórmios.

No cultivo de tecidos de *Rhynchostylis gigantea*, VAJRABHAYA & VAJRABHAYA (1970) utilizaram uma intensidade luminosa entre 2000 e 3000 lux (27 e $40,5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) obtida com lâmpadas fluorescentes e fotoperíodo de 14 horas.

Na propagação de *Dendrobium* a partir de brotos, KIM *et al.* (1970) utilizaram iluminação contínua na intensidade de 200 ft-c ($27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) Em plantas adultas de *Phalaenopsis* HARPER (1985) recomendou uma intensidade luminosa de 1000 a 1500 ft-c (135 a $202,7 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) com fotoperíodo de 12 a 14 horas.

KERBAUY & HANDRO (1981), trabalhando com embriões de *Cattleya intermedia* e de um híbrido primário entre (*Cattleya gutata* X *Epidendrum mosenii*), utilizaram fotoperíodo de 18 horas e intensidade luminosa de 1000 lux ($13,5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Na Tabela 2 pode-se observar as intensidades luminosas e os fotoperíodos utilizados na germinação e desenvolvimento de diversas espécies de orquídeas, citados por ARDITTI (1982).

TABELA 2 – Fotoperíodo e intensidade luminosa, utilizados na germinação e desenvolvimento de várias espécies de orquídeas segundo ARDITTI(1982).

Espécie	Fotoperíodo	Intensidade Luminosa
<i>Calypso bulbosa</i>	18h	200 lm/ft ² (27 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
<i>Corallorhiza maculata</i>	12h	200 lm/ft ² (27 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
<i>Cypripedium reginae</i>	12h	70 lm/ft ² (9,4 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
<i>Epipactis gigantea</i>	18h	200 lm/ft ² (27 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
<i>Goodyera oblongifolia</i>	12h	200 lm/ft ² (27 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
<i>Habenaria obtusata</i>	12h	200 lm/ft ² (27 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
<i>Arundina bambusifolia</i>	12h	3000 lux (40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
<i>Dactylorhiza purpurella</i>	12h	70 lm/ft ² (9,4 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
<i>Calante discolor</i>	16h	400 lux (5,4 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
<i>Calante furcata</i>	12h	2300 lux (31 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
<i>Cymbidium goeringii</i>	12-16h	2000-3000 lux (27- 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
<i>Cymbidium karan</i>	16h	4000-6000 lux (54 - 81 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
<i>Neofinetia falcata</i>	16h	3000 lux (40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
<i>Thunia marshalliana</i>	10h	2000 lux (27 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

Na organogênese de gemas de plantas híbridas de *Cattleya*, VENTURA *et al.* (2001) fizeram uso de fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 68 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Da SILVA (2003), testando meios de cultura para germinação de sementes de *Cattleya tigrina*, conduziu o experimento com intensidade luminosa de 1500 lux (20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 16 horas. MORAES (2003), obteve melhor resultado no desenvolvimento de *Oncidium trulliferum* acrescentando 1g de carvão ativado no meio de cultura e mantendo os frascos sob intensidade luminosa de 2000 lux (27 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 16 horas.

Na propagação da orquídea *Gongora quinquenervis* por semeadura *in vitro* MARTINI *et al.* (2001) mantiveram os frascos após a inoculação sob intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 16 horas.

Na cultura *in vitro* a partir de sementes de *Anoectochilus formosanus* uma importante orquídea medicinal de Taiwan, SHIAU *et al.* (2002) utilizaram 47 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa com fotoperíodo de 16 horas. Luz contínua foi utilizada por MIYOSHI & MII (1995) em germinação assimbiótica e posterior desenvolvimento de *Calante discolor* com intensidade luminosa de 9 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para clonar a orquídea do gênero *Paphiopedilum* HUANG *et al.* (2001) utilizaram o fotoperíodo de 16 horas e a intensidade luminosa de 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Em trabalho de germinação simbiótica de *Platanthera clavellata*, ZETTLER & HOFER (1998) deixaram as placas de Petri em uma primeira fase com intensidade luminosa de $28 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 14 horas e na fase seguinte as placas de Petri permaneceram no escuro sendo cobertas com papel alumínio. MILANEZE (1992) trabalhando com a influência de duas intensidades luminosas, 500 e 2000 lux ($6,7$ e $27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), e dois fotoperíodos, 12 e 24 horas, no desenvolvimento inicial de *Pseudolaelia vellozicola*, verificou os melhores resultados culturais expressos pelo número de raízes e folhas e suas dimensões foram obtidos com o tratamento de 2000 lux e fotoperíodo de 24 horas.

Com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ STENBERG & KANE (1998) realizaram a germinação e desenvolvimento *in vitro* de *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, uma orquídea da Flórida ameaçada de extinção. Ao analisar os efeitos do carvão ativado na propagação *in vitro* de orquídeas européias WAES (1987), manteve os tubos de ensaio com sementes de *Cypripedium calceolus* em completa escuridão.

ADELBERG *et al.* (1997), ao micropropagarem *Cattleya* utilizando o sistema de membrana e meio de cultura líquido manteve os vasos sob uma intensidade luminosa de $44 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 16 horas. BARROSO *et al.* (1990), trabalhando com germinação *in vitro* de orquídeas terrestres da Europa utilizou fotoperíodo de 10 horas e intensidade luminosa de 200 ± 10 lux ($2,7 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná e no Laboratório do Orquidário Garrett Dronk em Curitiba, Paraná. A espécie de orquídea testada neste trabalho foi a *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb. f.

3.1. OBTENÇÃO DAS PLANTAS

As sementes foram obtidas através do cruzamento entre duas plantas de *Cattleya amethystoglossa* cultivada em casa de vegetação. Após a fecundação a planta desenvolveu a cápsula que rompeu após quatro meses, permitindo que as sementes fossem colhidas. Estas sementes maduras foram armazenadas por 5 dias em envelope de papel acondicionado em um recipiente plástico com tampa, na parte inferior de um refrigerador com 4°C até o momento da semeadura. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e água deionizada e autoclavada conforme Figura 2. O tubo de ensaio, com as sementes e a solução desinfetante, ficou sob agitação por 10 minutos (Figura 2).

Após este período as sementes foram separadas da solução através de filtração, utilizando-se como filtro uma tela de poliéster, com 62 fios/cm² utilizada para serigrafia, previamente autoclavada por 30 min a 120°C e 1,5 atm, junto com a filtração é feita a retirada do excesso da solução com água deionizada e autoclavada.

As sementes depois de filtradas foram semeadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962). Após quatro meses as plantas foram repicadas para o meio MS onde permaneceram por 12 meses. Ao final deste período as plantas foram utilizadas para a instalação dos experimentos. As plantas utilizadas possuíam altura média de $0,4 \pm 0,1$ cm.

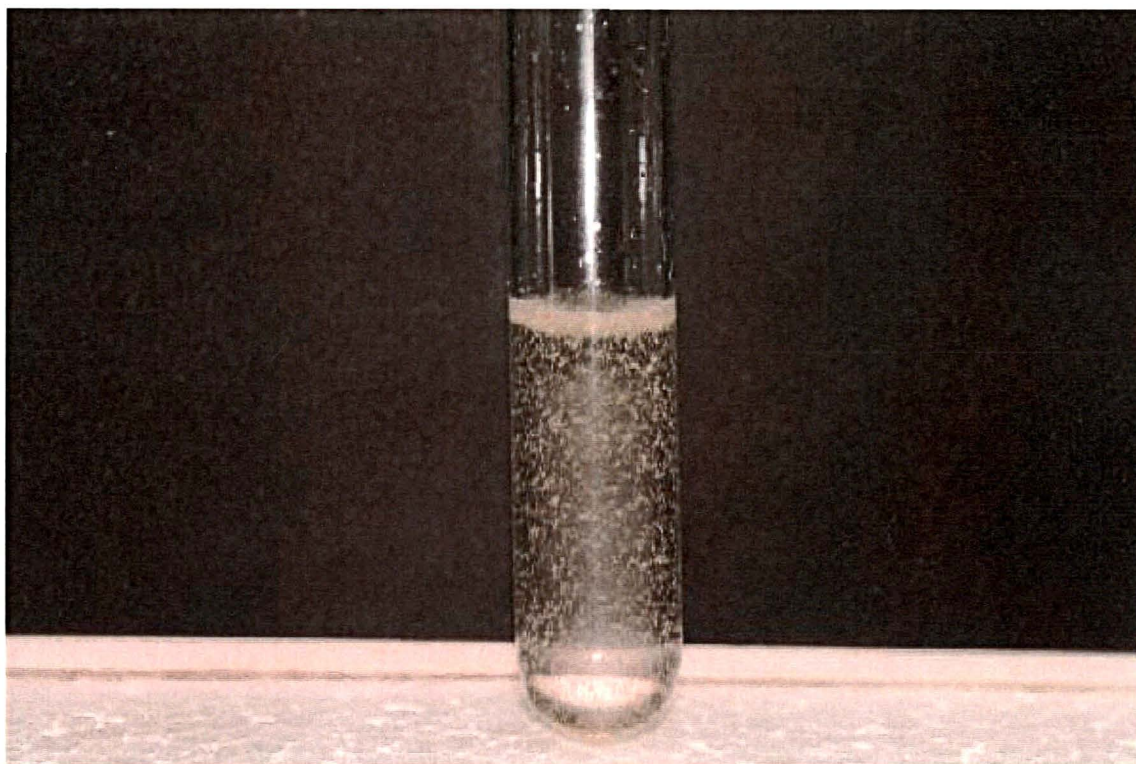


Figura 2 – Aspecto do tubo de ensaio no momento da desinfestação das sementes de *Cattleya amethystoglossa*.

3.2. EXPERIMENTO COM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Os frascos utilizados para o cultivo *in vitro* foram do tipo pote com capacidade de 250 ml, fechados com tampa plástica translúcida. Os meios de cultura MS, KC e Dronk tiveram o pH ajustado para 5,5 e foram autoclavados por 25 minutos a 120°C e 1,5 atm. A repicagem das plantas desenvolvidas em meio MS foi realizada em câmara com fluxo de ar asséptico, para frascos contendo 30 ml de meio e foram fechados com tampas plásticas transparentes com orifício para troca de gases cobertos com esparadrapo micropore e vedados com filme plástico de PVC. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com $22,9 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa, obtida com lâmpada Sylvania luz do dia plus F 20W T12 e fotoperíodo de 13 horas e temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Os tratamentos testados foram os seguintes: MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), KC (KNUDSON C, 1946) e Dronk, cujas composições são descritas na Tabela 3. Todos os meios tiveram o pH ajustado para 5,5. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 repetições e 3 frascos por parcela. Em cada frasco foram colocadas 15 plantas. O experimento foi repetido duas vezes.

Após 180 dias foi realizada a avaliação dos experimentos, sendo que as plantas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente para retirar o meio de cultura aderido às raízes e secas em papel absorvente. As variáveis analisadas foram as seguintes: altura da planta (medida da base até o ápice da folha mais alta), comprimento das raízes (pela soma do comprimento em centímetros de todas as raízes com comprimento acima de 1mm emitidas pela planta), a massa fresca por planta (determinada com a utilização de balança de precisão digital), o número de plantas vivas por frasco e taxa de crescimento (determinado pela diferença de altura das plantas no início do experimento até a avaliação).

Depois da avaliação as plantas foram transplantadas para vasos coletivos separadas de acordo com o meio de cultura utilizado no desenvolvimento (Figura 8).

3.3 EXPERIMENTO COM DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS

A repicagem das plantas com altura média de $0,4 \pm 0,1$ cm foi realizada em câmara com fluxo de ar asséptico, sendo que os frascos contendo 30 ml do meio de cultura MS foram fechados com tampas plásticas transparentes e vedados com filme plástico de PVC. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A obtenção das plantas utilizadas no experimento está descrita no item 3.1.

Os tratamentos testados foram as seguintes intensidades luminosas: 800, 1800 e 2000 lux. Esses valores foram medidos com o auxílio de um luxímetro manual da marca Lutron Light meter LX 103 e depois transformados para $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ segundo ARDITTI & ERNST (1992), obtendo então valores $10,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $24,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente. Essas intensidades foram obtidas utilizando-se 1, 2 e 3 lâmpadas fluorescentes do tipo HO 100W por prateleira, respectivamente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições e 3 frascos por parcela. Em cada frasco foram colocadas 10 plantas.

Após 160 dias foi realizada a avaliação dos experimentos, sendo as plantas retiradas dos frascos e lavadas em água corrente para retirar todo o meio de cultura aderido às raízes e secas em papel absorvente. As variáveis analisadas foram as seguintes: largura de folha (medida na parte mais larga da folha), comprimento das raízes (pela soma do comprimento em centímetros de todas as raízes com comprimento

acima de 1mm emitidas pela planta), a massa fresca por planta (determinada com a utilização de balança de precisão digital) e o número de plantas vivas por frasco.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett e aqueles que não apresentavam homogeneidade de variância foram transformados em arco do seno da raiz de $x/100$ ou $\log x+1$ para proceder a análise da variância. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os programas computacionais utilizados foram o SANEST para análise da variância e o STATGRAFYCS para o teste de Bartlett.

TABELA 3 - Composição química dos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), KC (Knudson C, 1946) e Dronk.

Nutriente	Quantidade
MEIO MS (Murashige e Skoog, 1962)	mg.L ⁻¹
Nitrato de Amônia – NH ₄ NO ₃	1650
Nitrato de Potássio – KNO ₃	1900
Cloreto de Cálcio – CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Sulfato de Magnésio – MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
Fosfato de Potássio Monobásico – KH ₂ PO ₄	170
Ácido Bórico – H ₃ BO ₃	6,2
Sulfato de Manganês – MnSO ₄ . H ₂ O	22,3
Sulfato de Zinco – ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6
Iodeto de Potássio – KI	0,83
Molibdato de Sódio – Na ₂ MoO ₄ . 5H ₂ O	0,25
Sulfato de Cobre – CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025
Cloreto de Cobalto – CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025
Ácido Nicotínico	0,5
Piridoxina HCl	0,5
Tiamina	0,1
Glicina	2,0
E.D.T.A. Bissódico - Na EDTA	37,3
Sulfato de Ferro - FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8
Mioinositol	100
Sacarose	30000
Ágar (Vetec [®])	7000
MEIO KC (Knudson C, 1946)	mg.L ⁻¹
Sulfato de Amônia – (NH ₄) ₂ SO ₄	500
Sulfato de Magnésio – MgSO ₄ . 7H ₂ O	7400
Nitrato de Cálcio – Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	1000
Fosfato de Potássio Monobásico – KH ₂ PO ₄	250
Sulfato de Ferro - FeSO ₄ . 7H ₂ O	25
Sulfato de Manganês - MnSO ₄ . H ₂ O	7,5
Ágar (Vetec [®])	7000
Glicose	20000

MEIO Dronk

Banana nanicão	150g/L
Água de coco	150ml/L
Açúcar cristal	20g/L
Ágar (utilizado na culinária oriental)	7g/L
Aduto Dyna-Gro [®] (7-7-7)	
NH ₄ - 2,1%	
NO ₃ - 4,9%	
P ₂ O ₅ - 7,0%	
K ₂ O - 7,0%	
Ca - 2,0%	
Mg - 0,5%	
S - 0,05%	
B - 0,007%	
Cl - 0,006%	
Co - 0,0005%	
Cu - 0,007%	
Fe - 0,07%	
Mn - 0,05%	
Mo - 0,0009%	
Ni - 0,0001%	
Na - 0,05%	
Zn - 0,009%	

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXPERIMENTO COM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Na Tabela 4, estão apresentados os valores médios para o número de plantas vivas (%), massa fresca por planta (mg), altura das plantas (cm), comprimento de raízes por planta (cm) e taxa de crescimento (%).

TABELA 4. Efeito de diferentes meios de cultura no desenvolvimento de *Cattleya amethystoglossa* *in vitro* após 180 dias. Médias de dois experimentos.

Meios de cultura	Plantas vivas (%) ²	Massa fresca por planta (mg)	Altura da planta (cm)	Comprimento de raízes por planta (cm) ³	Taxa de Crescimento (%)
Dronk	99,3 a	89,5 a	0,63 a	4,0 a	57,2 a
MS	90,2 b	57,6 b	0,51 b	1,8 b	30,7 b
KC	81,5 c	44,4 b	0,49 b	0,7 c	21,7 c
CV(%)	5,5	18,9	6,8	22,4	14,1

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

²Dados transformados em arc sen raiz x/100 para análise.

³Dados transformados em raiz x+1 para análise.

Os resultados demonstraram que para a variável plantas vivas, ocorreram diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de significância entre o meio Dronk quando comparado aos meios MS e Knudson C, no meio Dronk ocorreu a menor taxa de mortalidade de plantas 0,7%, sendo que no meio Knudson C ocorreu a maior taxa 18,5% (Tabela 4). Na variável massa fresca houve um acréscimo de massa nas plantas que estavam crescendo no meio Dronk, sendo este resultado significativamente superior ao meio de cultura MS, que por sua vez não diferiu do meio de cultura Knudson C. Da SILVA (2003), utilizando meio de cultura contendo adubo Dyna-Gro 7-9-5, tomate cereja, banana e água de coco para desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina*, também obteve resultados melhores de massa fresca, em comparação com o meio MS.

Para a variável altura da planta houve significativamente uma superioridade das plantas que cresciam no meio Dronk em relação às plantas que estavam no meio MS e Knudson C. Estes dois últimos meios não diferiram entre si (Figura 3).

Para o comprimento das raízes (Tabela 4) houve uma diferença bastante acentuada entre os três tratamentos, sendo que o melhor resultado foi observado no meio Dronk enquanto o meio Knudson C apresentou o menor resultado. Na variável

taxa de crescimento as plantas que estavam no meio Dronk apresentaram um crescimento significativamente superior aos demais tratamentos (Figura 4). Este resultado juntamente com o resultado da variável comprimento de raízes demonstram a superioridade do meio Dronk. Esta superioridade foi benéfica quando as plantas foram levadas para casa-de-vegetação pois a taxa de mortalidade na aclimatização foi menor (Figura 5).

Os resultados superiores obtidos pelo meio Dronk com relação aos demais meios, podem ser decorrentes da adição da banana e da água de coco. Sendo que esta última tem em sua composição diversas substâncias orgânicas, inclusive hormônios naturais como a zeatina (Quadro 1). DA SILVA (2003) relaciona o bom resultado obtido com meio a base de banana, água de coco e tomate cereja com o fato da água de coco possuir um efeito tamponante, ou seja, ela ajuda a estabilizar o pH no meio durante o tempo de cultura, isto é importante, pois uma maior absorção de nutrientes ocorre num pH ideal, que no caso, para orquídeas fica entre 5,0 e 5,5.

Na germinação e desenvolvimento de *Anoectochilus formosanus* também foram obtidos melhores resultados com o meio de cultura MS suplementado com 8% de polpa de banana (SHIAU *et al.* 2002). Trabalhando com clonagem de *Paphiopedilum*, HUANG *et al.* (2001) obtiveram maior quantidade de brotos e raízes adicionando ao meio MS, 15% (v/v) de leite de coco e 20 g de polpa de banana.

MARTINI *et al.* (2001) descreveram que o meio nutritivo Knudson C é considerado, como um dos mais adequados à germinação de orquídeas epifíticas tropicais. Mas no experimento que realizaram utilizando o meio nutritivo Knudson C, estes mesmos autores relataram também a necessidade que embriões da espécie *Gongora quinquenervis* requerem, para sua germinação e posterior desenvolvimento, de um meio nutritivo mais complexo e/ou mais concentrado que o Knudson C.

O adubo utilizado no meio de cultura Dronk, tem em sua composição macronutrientes e micronutrientes, sendo que esta formulação foi feita para atender em grande parte as exigências nutricionais das orquídeas em geral. Pois é um adubo foliar bastante utilizado no cultivo *ex-vitro*, sendo um possível fator de sucesso do meio Dronk pois utiliza um adubo desenvolvido para orquídeas.



Figura 3 - Aspecto das plantas de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb. f., após 180 dias de desenvolvimento nos meios de cultura Dronk (1), MS (2) e Knudson C (3).

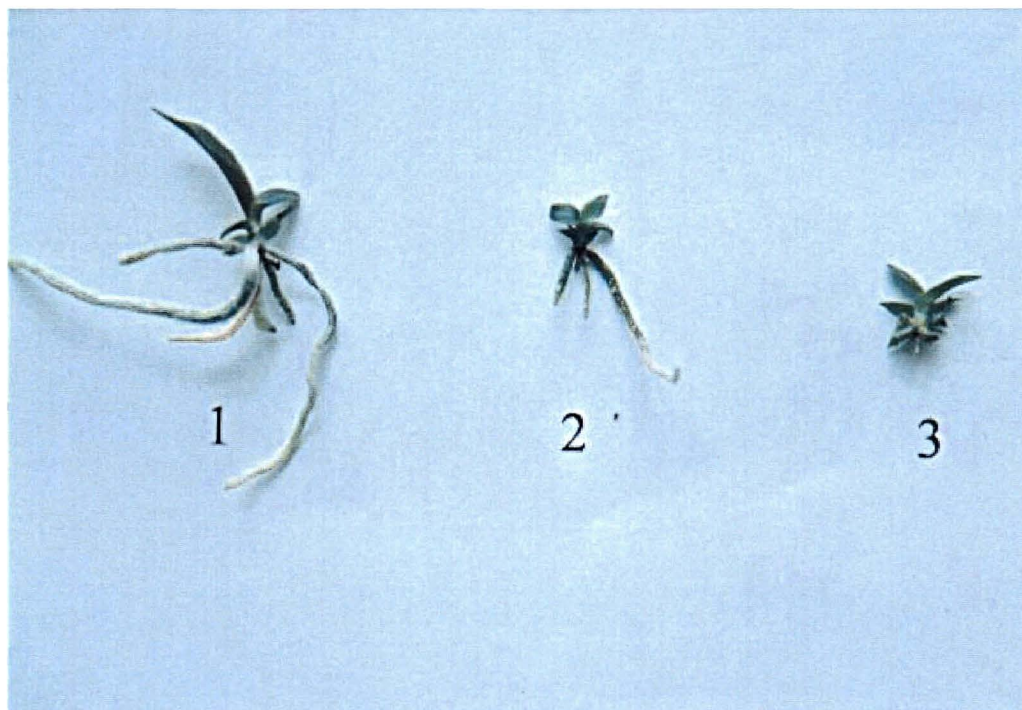


Figura 4 - Detalhe de uma planta de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb. f., após 180 dias de desenvolvimento nos meios de cultura Dronk (1), MS (2) e Knudson C (3).

A comparação de custos dos meios pode ser observada na Tabela 5, que mostra o menor custo o meio Dronk, pois 1 litro custou R\$ 1,54, enquanto 1 litro de meio de cultura MS custou R\$ 8,95, ou seja, cerca de 5,8 vezes mais. Na análise do custo por planta cabe ressaltar que neste custo, só está sendo computado o gasto com o meio de cultura. Isto é, não estão sendo computados os gastos com vidraria, energia elétrica, tampas, filmes plásticos, mão de obra e outros custos do laboratório.

Além do custo por muda produzida no meio de cultura Dronk ser menor, o número de plantas vivas obtidas nesse meio foi maior do que nos outros, o que é muito favorável para a produção comercial de plantas *in vitro*.

Outro fator favorável do meio Dronk para a produção em biofábricas é a facilidade de obtenção dos componentes do meio de cultura, principalmente pela não utilização dos nitratos, cuja venda é controlada pelo Ministério da Defesa em Decreto Federal Nº 3665 de 20 de Novembro de 2000 que regulamenta a fiscalização de produtos controlados. Os nitratos de amônia e de potássio, são considerados produtos químicos de interesse militar e em função disso a sua comercialização é controlada pelo Exército.

TABELA 5. Comparação de custo entre os meios de cultura utilizados no desenvolvimento da *Cattleya amethystoglossa in vitro* (novembro/2003).

Meios de cultura	Custo por litro	Custo por planta
MS	R\$ 8,95	R\$ 0,010
KC	R\$ 2,75	R\$ 0,004
Dronk	R\$ 1,54	R\$ 0,002

Na Figura 5 podemos observar a diferença de crescimento entre as plantas que foram cultivadas no meio Dronk (1) das demais. Esta diferença está relacionada ao vigor das plantas que foram cultivadas no meio Dronk, no momento do transplante apresentavam-se maiores e com mais raízes, o que favoreceu o crescimento *ex vitro*. A fase da aclimatização exige muitos cuidados, pois nesta fase pode ocorrer a morte das plantas devido a diferença de ambientes. Quando cultivadas *in vitro* as plantas estão num ambiente totalmente protegido onde não ocorre mudança de umidade, temperatura e iluminação, ao contrário do que ocorre quando são retiradas dos frascos. Nesse nova condição, as plantas terão que se adaptar, se a planta estiver mais desenvolvida, esta adaptação se dará de forma mais rápida e com menor prejuízo.



Figura 5 - Aspecto de algumas plantas de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb. f. plantadas em vasos coletivos 1 – Meio Dronk, 2- Meio MS, 3- Meio Knudson C.

4.2 EXPERIMENTO COM DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS

Na Tabela 6, estão apresentados os valores médios para o número de plantas vivas por frasco (%), massa fresca por planta (mg), largura de folha (cm), comprimento das raízes por planta (cm). Na avaliação da porcentagem de plantas vivas não houve diferença significativa entre os tratamentos. Mas pode-se observar que a maior porcentagem de plantas mortas ocorreu no tratamento com $27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e a menor porcentagem de plantas mortas foi verificada no tratamento de $10,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ MILANEZE (1992) obteve a melhor média de germinação de *Pseudolaelia vellozicola* utilizando uma intensidade luminosa de 500 lux ($6,75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e 24 horas de fotoperíodo e a menor média foi obtida com uma intensidade luminosa de 2000 lux ($27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 12 horas.

Na variável massa fresca todos os tratamentos foram estatisticamente semelhantes não diferindo entre si de forma significativa. Entretanto o tratamento com intensidade luminosa de $10,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ obteve a maior média em comparação aos outros dois tratamentos. Observou-se que o tratamento com $24,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ficou com

média inferior ao tratamento de $10,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ mas foi superior ao tratamento de $27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Tal relação ocorreu também na variável plantas vivas. Trabalhando com diferentes intensidades luminosas MILANEZE (1992) obteve os melhores valores de massa fresca em plantas possuidoras de 2 folhas no tratamento com 500 lux ($6,75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) de intensidade luminosa e fotoperíodo de 12 horas e os menores valores no tratamento de 2000 lux ($27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 24 horas. Após seis meses de cultivo MILANEZE (1992) obteve as mais altas porcentagens de plantas com folhas e raízes formadas no tratamento com 500 lux ($6,75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 24 horas.

Analisando a variável largura das folhas observa-se que os tratamentos com $24,3$ e $27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, foram estatisticamente iguais, sendo que o tratamento de $24,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ obteve média superior ao tratamento com $27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa. O tratamento com $10,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ nesta variável mostrou-se significativamente superior aos outros dois tratamentos. Isto pode ser observado na Figura 6.

MILANEZE (1992) observando o número de folhas após seis meses de cultivo constatou que as plantas com número maiores de folhas estavam expostas a uma intensidade luminosa de 2000 lux ($27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 24 horas.

Na variável comprimento de raízes o tratamento com $10,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi superior aos demais, mas significativamente superior somente em relação ao tratamento de $27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. O tratamento com $24,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi estatisticamente semelhante aos outros dois tratamentos.

TABELA 6. Efeito das diferentes intensidades luminosas no desenvolvimento de *Cattleya amethystoglossa* in vitro após 160 dias.

Intensidade luminosa	Plantas vivas (%)	Massa fresca por planta (mg)	Largura de folha (mm)	Comprimento de raízes por planta (cm)
$10,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	84,6 a	4,9 a	1,22 a	0,76 a
$24,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	80,6 a	3,6 a	1,08 b	0,36 ab
$27,0 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	71,4 a	2,8 a	1,04 b	0,22 b
CV (%)	14,0	37,4	6,7	26,2

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

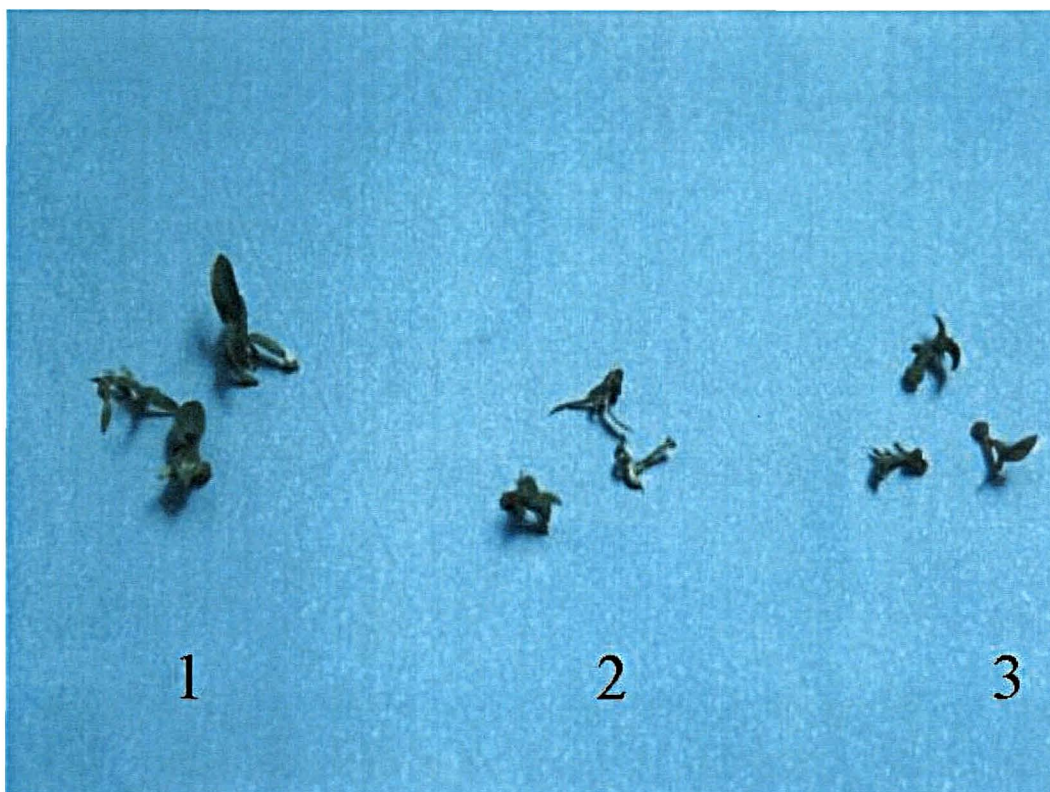


Figura 6 - Aspecto de algumas plantas de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb. f. após 160 dias de desenvolvimento no meio MS expostas a diferentes intensidades luminosas: 1 – $10,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 2 - $24,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 3 - $27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

5. CONCLUSÕES

Os resultados alcançados nesta pesquisa, permitiram concluir que o meio de cultura Dronk é mais eficiente do que os meios de cultura MS e Knudson C e de menor custo.

No experimento com diferentes intensidades luminosas, cabe salientar que o meio de cultura utilizado foi o MS e com base nos resultados o melhor tratamento foi $10,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para o desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb. f..

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como considerações finais, sugiro novas pesquisas com diferentes espécies de orquídeas, seja em trabalhos com multiplicação sexuada ou em trabalhos de clonagem.

Novos estudos que permitam a utilização do meio Dronk em biofábricas.

Novos estudos com menores intensidades luminosas, seriam interessantes já que a intensidade de $10,8 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi a que apresentou o melhor resultado.

REFERÊNCIAS

ADELBERG, J. W., DESAMERO, N. V., HALE, S. A., YONG, R. E. Long-term nutrient and water utilization during micropropagation of *Cattleya* on a liquid/membrane system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 48, p. 1-7, 1997.

ARDITTI, J. *et al.* Orchid seed germination and seedling culture – a manual. In: ARDITTI, J. (ed). **Orchid biology**: reviews and perspective II. New York: Cornell University Press. 370 p. 1982.

ARDITTI, J. ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. Califórnia: Joseph Arditti, Robert Ernest. “A Wiley – Interscience publication”, 1992. 680p.

BARROSO, J., FEVEREIRO, P., OLIVEIRA, M. M., PAIS, M.S.S. *In vitro* seed germination, differentiation and production of minitubers from *Ophrys lutea* Cav., *Ophrys fusca* Link, *Ophrys speculum* Link. **Scientia Horticulturae**, v.42, p. 329-337, 1990.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1998. p. 87- 132.

CAMPACCI, M. A. **Flora Brasileira Orquídeas (1)** CD-ROOM. 2000.

CAMPOS, D.M. **Orquídeas: manual prático de cultivo**. Rio de Janeiro: Darly Machado de Campos. Ed. Expressão e Cultura. 1996. 143 p.

CAMPOS, D.M. **Orquídeas: manual prático de reprodução**. Rio de Janeiro: Darly Machado de Campos. Ed. Expressão e Cultura. 2000. 127 p.

COLLINS, M. T., DIXON, K. W. Micropropagation of an Australian terrestrial orchid *Diuris longifolia* R. Br. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 32, p. 131-135, 1992.

Da SILVA, A. L. L. Avaliação de uma receita para cultivo de orquídeas *in vitro*. **Orquidário**, v. 17, n. 1, p. 28-30, 2003.

GAMBORG, O. L., MILLER, R.A., OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p. 151-158, 1968.

HARPER, T., *Phalaenopsis* culture revisited. **American Orchid Society Bulletin**, v. 54, n. 8, p. 947 –954, 1985.

HUANG, L.-C., LIN, C.-J., KUO, C.-I. *Paphiopedilum* cloning *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 91, p. 111-121, 2001.

KERBAUY, G.B.; HANDRO, W. Estudo do desenvolvimento *in vitro* de embriões de orquídeas. In: ENCONTRO NACIONAL DE ORQUIDÓLOGOS, 1., 1981, Rio de Janeiro, RJ. **Anais ... Rio de Janeiro: Expressão e Cultura**, 1981. p. 145-152.

KIM, K., KUNISAKI, J. T., SAGAWA, Y. Shoot-tip culture of *Dendrobium*. **American Orchid Society Bulletin**, v. 39, n. 12, p. 1077-1080, 1970.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v.15, p. 214-217, 1946.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. M.; MROFINSKI, L. A. (Ed.) **Cultivo de Tejidos en la Agricultura**. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 41- 77.

MARTINI, P.C.; WILLADINO, L.; ALVES, G.D.; DONATO, V.M.T.S. Propagação de orquídeas *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 10, p. 1319-1324, out. 2001.

MILANEZE, M. A. **Influência da intensidade luminosa e do fotoperíodo no desenvolvimento inicial de *Pseudolaelia vellozicola* (HOENE) PORTO & BRADE, a partir de sementes selecionadas por densidade.** Rio Claro, 1992. 193 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Área de Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

MIYOSHI, K., MII, M. Phytohormone pré- treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calante discolor* [Orchidaceae], in assymbiotic culture. **Scientia Horticulture**, v. 63, p. 263-267, 1995.

MORAES, L. M. **Influência do Carvão Ativado na Propagação *in vitro* de Três Espécies de Orquídeas Brasileiras.** Londrina, 2003. 32 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473- 497, 1962.

RAMOS, M.S.S. **A Orquídea e sua reprodução pela semente.** São Paulo: Mercedes Seng da Silva Ramos. Ed. Saraiva, 103 p., 1969.

SHIAU, Y. J., SAGARE, A. P., CHEN, U. C., YANG, S. R., TSAY, H.-S. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and *in vitro* culture of seeds. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 43, p. 123-130, 2002.

SILVA, W. **Cultivo de orquídeas no Brasil.** 6^a. edição. São Paulo: Waldemar Silva. Ed. Nobel. 96p., 1986.

STENBERG, M. L., KANE, M. E. *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, an endangered Florida orchid. **Lindleyana**, v. 13, p. 101-112, 1998.

VAJRABHAYA, M., VAJRABHAYA, T. Tissue culture of *Rhyncosthylis gigantea*, a monopodial orchid. **American Orchid Society Bulletin**, v. 39, n. 10, p. 907-910, 1970.

VENTURA, G. M., DIAS, J. M. M., TEIXEIRA, S. L., CARVALHO, V. S., NOVAIS, R. F., MOTOIKE, S. Y., GROSSI, J. A. S. Organogênese *in vitro* em gemas axilares dianteiras de plantas adultas de híbridos do grupo *Cattleya*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 7, n.2, p. 157-163, 2001.

WAES, J. Effect of activated charcoal on *in vitro* propagation of western european orchids. **Acta Horticulturae**. n. 212, p. 131- 138, 1987.

WAES, J. M., DEBERGEH, P. C. *In vitro* germination of some western European orchids. **Physiologia Plantarum** v. 67, p. 253-261, 1986.

WANG, X.-J., LOH, C.-S., YEOH, H.-H., SUN, W.Q. Differential mechanisms to induce dehydration tolerance by abscisic acid and sucrose in *Spathoglottis plicata* (*Orchidaceae*) protocorms. **Plant Cell and Environment**, v. 26, p. 737-744, 2003.

WHITE, P. R., Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. **American Journal of Botany**, v. 30, p. 33-36, 1943.

WILFRET, G. J. Formation of protocorm-like bodies on excised *Cymbidium* shoot tips. **American Orchid Society Bulletin**, v. 35, n. 10, p. 823-827, 1966.

ZETTLER, L. W., HOFER, C. J. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and ecological implications. **Environmental and Experimental Botany**, v. 39, p. 189-195, 1998.

Composição nutricional da banana www.nucleoestudo.ufla.br/nefrut/Tabela2.htm acesso em: 10 de dezembro de 2003.

ANEXOS

ANEXO 1. Quadro de análise de variância da variável plantas vivas do experimento de meio de cultura.

Causas de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Probabilidade
Tratamentos	2	595.9228031	0,00012
Erro	12	21.9375294	
Total	14		

Teste de Bartlett: 1,08835 Valor-P = 0,63307

ANEXO 2. Quadro de análise de variância da variável massa fresca por planta do experimento de meio de cultura.

Causas de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Probabilidade
Tratamentos	2	2679.8287469	0,00041
Erro	12	146.6563392	
Total	14		

Teste de Bartlett: 1,35445 Valor-P = 0,194299

ANEXO 3. Quadro de análise de variância da variável altura da planta do experimento de meio de cultura.

Causas de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Probabilidade
Tratamentos	2	0.0293600	0,00028
Erro	12	0.0014233	
Total	14		

Teste de Bartlett: 1,09759 Valor-P = 0,604816

ANEXO 4. Quadro de análise de variância da variável comprimento de raízes por planta do experimento de meio de cultura.

Causas de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Probabilidade
Tratamentos	2	1.0797654	0,00001
Erro	12	0.0150153	
Total	14		

Teste de Bartlett: 1,34021 Valor-P = 0,205717

ANEXO 5. Quadro de análise de variância da variância taxa de crescimento do experimento de meio de cultura.

Causas de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Probabilidade
Tratamentos	2	1708.8602967	0.00001
Erro	12	26.6730578	
Total	14		
Teste de Bartlett: 1,05646 Valor-P = 0,7433			

ANEXO 6. Quadro de análise de variância da variável plantas vivas do experimento com diferentes intensidades luminosas.

Causas de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Probabilidade
Tratamentos	2	229.0666667	0.19729
Erro	12	123.300000	
Total	14		
Teste de Bartlett: 1,69631 Valor-P = 0,0576327			

ANEXO 7. Quadro de análise de variância da variável massa fresca do experimento com diferentes intensidades luminosas.

Causas de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Probabilidade
Tratamentos	2	5.7886620	0.09296
Erro	12	1.9976674	
Total	14		
Teste de Bartlett: 1,1199 Valor-P = 0,542529			

ANEXO 8. Quadro de análise de variância da variável largura da folha do experimento com diferentes intensidades luminosas.

Causas de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Probabilidade
Tratamentos	2	0.0446669	0.00672
Erro	12	0.0056666	
Total	14		
Teste de Bartlett: 1,07371 Valor-P = 0,681086			

ANEXO 9. Quadro de análise de variância da variável comprimento das raízes do experimento com diferentes intensidades luminosas.

Causas de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Probabilidade
Tratamentos	2	0.3926666	0.01060
Erro	12	0.0576667	
Total	14		
Teste de Bartlett: 1,40809		Valor-P = 0,15754	